

---

## 総 説

---

### 神経幹細胞の性質と移植後の分化動態について

三留 雅人

キーワード：神経幹細胞，移植，再生医療，中枢神経，咀嚼

#### Studies on Neural Stem Cells and Differentiation after Transplantation into Central Nervous System.

Masato MITOME

**Abstract :** Generation of neurons in the mammalian central nervous system (CNS) is believed to end by early postnatal life. However, neurogenesis has been demonstrated in different regions of both the developing and mature CNS. In such areas, neural stem cells and progenitor cells have been isolated using trophic factors. When the cells are cultured in a chemically defined, serum-free medium with epidermal growth factor (EGF) or basic fibroblast growth factor (FGF-2), they proliferate as cellular clusters floating in the medium ('neurospheres'). *In vitro*, clonal analyses indicate that such cells can individually generate neurons, astrocytes and oligodendrocytes. Cells from expanded neurosphere cultures are grafted into various regions of CNS, including hypothalamus, hippocampus, medulla oblongata and subventricular zone. FGF-2 and EGF-responsive cells differentiate predominantly give rise to glial cells. Some of FGF-2-responsive cells transplanted into neurogenic regions of mouse brain differentiate into region-specific neurons. The characters and relative advantages of these cells for cell replacement therapy are discussed.

#### I. はじめに

近年，幹細胞（stem cells）が次々と発見され，これらの細胞の性質を治療に応用した再生医療が発展した。胚性幹細胞 ES 細胞（embryonic stem cell）は，生体のあらゆる細胞に分化が可能であり，その中心的な役割を果たすと期待されている<sup>1)</sup>。しかし，ヒトの ES 細胞を利用する場合，受精卵を使用するため倫理的な問題があり，また，移植による拒絶反応など解決しなければならない問題も多い。一方，ES 細胞以外にも体性幹細胞と呼ばれる幹細胞が報告され，造血幹細胞，間葉系幹細胞，神経幹細胞および肝幹細胞などが同定されている。これらの細胞は，成体においても存在し，自家移植が可能である。これらの体性幹細胞は ES 細胞ほどの全能性はない

と言われてきたが，体性幹細胞は他の種類の幹細胞に分化転換が可能であり，一部の体性幹細胞は ES 細胞に匹敵する万能性を持つことも報告されている<sup>2)</sup>。これらの体性幹細胞を再生医療に利用する研究がさかんに行われている。

中枢神経系では，出生前にほぼすべてのニューロンが分裂を終了する。しかし，海馬の歯状回や側脳室周辺に神経幹細胞が存在し<sup>3)</sup>，ニューロンやグリア細胞など複数の神経細胞に生涯にわたって増殖および分化を続けていることが判明した。この細胞の性質を把握し，再生治療に応用することにより，中枢神経疾患の治療が可能となりつつある。従来より，一度損傷を受けた神経はその再生が困難であると考えられており，そのため脊髄損傷

に代表される中枢神経系の疾患の根本的治療は不可能と考えられてきた。しかし、神経幹細胞が発見されると従来の常識が覆され、難病とされてきた神経疾患の治療に光明が当たることになった。神経幹細胞は成人であっても分裂を続けることから、この細胞を患者自身から採取し、培養して大量に増殖させてから患部に移植を行う方法、あるいは遺伝子導入や培養条件を変えて目的の神経細胞に分化させてから移植する方法によって、中枢機能の回復が可能になりつつある。また、神経幹細胞をあらかじめ採取後冷凍保存を行い、疾患にそなえて長期保存することも可能であり、さらに、ES細胞の持つ倫理的問題や拒絶反応の問題も解決できることから、将来再生医療の中核になると考えられている。歯科分野においては、脳性まひや脳梗塞により中枢神経が損傷した場合、咀嚼をはじめとする摂食困難および感覚異常など口腔領域の問題解決に再生医療が応用される可能性が高い。

## II. 神経幹細胞の特徴

幹細胞の定義は、1) 幹細胞が分裂して幹細胞を作ることができる（自己複製能）、2) 複数の異なる細胞に分化できる（多分化能）、の2点である。神経幹細胞は、それ自身が自己増殖し、また神経活動の本体であるニューロン、およびニューロンの活動をサポートするオリゴデンドロサイトやアストロサイトのようなグリア細胞に分化することが可能である。側脳室下帯 subventricular zone (SVZ) や海馬の歯状回 dentate gyrus には出生後も増殖を続ける神経幹細胞が存在する（図1）。

### i) 側脳室下帯 (SVZ)

脳内に広く分布している側脳室の周辺には、出生後も増殖する神経幹細胞があることが知られており、1日に数万個の分裂がみられる。この細胞はグリア前駆細胞に分化し、白質、新皮質および線条体に移動し、オリゴデンドロサイトやアストロサイトに分化する。また、ニューロンの前駆細胞に分化して、rostral migratory stream (RSM) をおよそ2～4週間かけて移動し、嗅脳に達しニューロンに分化している<sup>4,5)</sup>。動物実験では、神経幹細胞の培養はこの部位を採取して行う事が多い。ヒトにおいても同部位に神経幹細胞の存在が確認されており、採取法の検討が行われている。

### ii) 歯状回 dentate gyrus

海馬は、記憶や空間の認識などに関与しており、中枢神経内において最も研究が進んでいる部位の一つである。海馬の歯状回の顆粒層において神経幹細胞が発見され、一日に数千個の細胞が生後も分裂し続けていることが判明すると、これを長く維持する環境条件が検討されてきた。Kempermannらは、マウスを、通常よりも広いケージで飼育し、その中に、トンネルなどの玩具を置き豊かな環境 (environmentally enriched condition) にすると歯状回の神経幹細胞のニューロンへの分化やその生

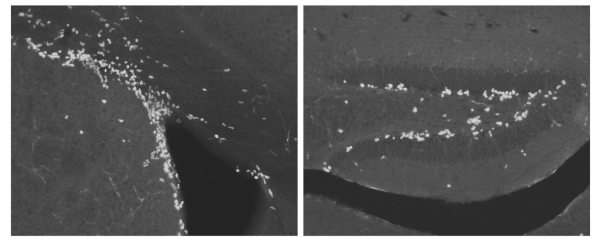


図1 マウス側脳室下帯 subventricular zone (SVZ, 左図) と海馬の歯状回 dentate gyrus (DG, 右図) にみられた神経幹細胞。分裂した細胞の核を bromodeoxyuridine (BrdU) の抗体で免疫染色した。

存率が高くなることを示し、歯状回の神経幹細胞の分裂や維持に関係する環境因子を始めて同定した点で注目を集めている<sup>6)</sup>。さらに、マウスをランニングホイールに入れて自発的に運動をさせると歯状回の神経幹細胞が増殖することが判明した<sup>7)</sup>。これらの研究結果は、歯状回の神経幹細胞を生涯維持するには、豊かで適度な刺激のある環境で、適度な運動を行うことが必要であることを示唆している。一方、歯科的には、高齢者における歯の喪失はアルツハイマー型痴呆の誘発因子に挙げられており<sup>8)</sup>、また、咀嚼が海馬の神経活動に影響している可能性が示唆されてきた<sup>9-12)</sup>。そこで、咀嚼と歯状回の神経幹細胞の関係を調べるために以下の研究を行った。生後4週と12週齢マウスをそれぞれ、1) 固形食投与群（通常の飼育用固形食を与えたもの）、2) 粉末食投与群（固形食を細かく砕き粉末状にしたもの）に分け、10週間飼育した。次に体重あたり50  $\mu\text{g/g}$  の bromodeoxyuridine (BrdU) を1日1回12日間、腹腔に投与した。投与後、それぞれの条件でさらに5週間飼育した後、灌流固定を行い、脳切片を作成した。各スライスの中の BrdU 陽性細胞をカウントし、歯状回あたりの全 BrdU 陽性細胞数を算出し、各群の差を比較した。生後12週齢マウスにおいては、4週齢マウスに比べ、全体的な BrdU 陽性細胞が低下したが、両週齢において固形食投与群に比べ粉末食投与群の方が有意に BrdU 陽性細胞の減少がみられた（図2）。次に、歯状回の神経幹細胞が栄養分や体重の違いで変動するか調べるために、生後4週齢マウスに主に高カロリー食（玄米）の固形及びその粉末を与えて比較した。高カロリー食を与えると体重が増加したが、粉末食投与群では、同様に歯状回の神経幹細胞数が低下したことから、この現象は体重の変動や栄養状態の影響を受けないことが判明した（図3）。さらに、臼歯部抜歯によって、ニューロンへの分化率が低下し<sup>13)</sup>、以上の結果は、歯を生涯維持し、よく噛んで食べることは海馬歯状回の神経幹細胞を維持するために重要な因子であることを示唆した。

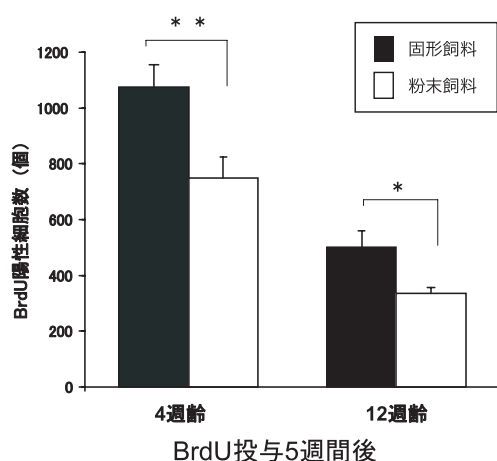


図2 咀嚼がマウス海馬歯状回の神経幹細胞に与える影響（1）  
粉末飼料投与群では固形飼料投与群に比べて、神経幹細胞数の有意な低下が見られた。12週齢では、神経幹細胞数が全体的に低下したが、粉末飼料投与群では週齢に影響なく低下がみられた（\*\*： $p < 0.01$ ，\*： $p < 0.05$ ）。

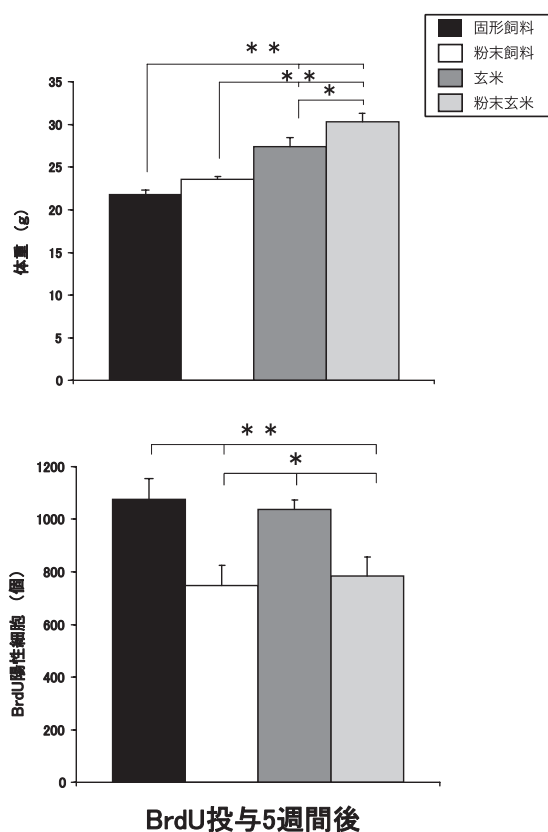


図3 咀嚼がマウス海馬歯状回の神経幹細胞に与える影響（2）  
粉末飼料投与群では固形飼料投与群に比べて、神経幹細胞数の有意な低下が見られた。粉末食投与群では高カロリー食や体重の増加に関係なく神経幹細胞数の低下がみられた（\*\*： $p < 0.01$ ，\*： $p < 0.05$ ）。

### Ⅲ. 神経幹細胞の培養とその性質

胎生16日目のマウスの線条体から細胞を採取し、成長因子として epidermal growth factor (EGF) や basic fibroblast growth factor (FGF-2) の入った神経培養液で1週間培養すると細胞は分裂して球状の浮遊細胞塊 (neurosphere) を形成する<sup>14, 15)</sup> (図4)。さらに、neurosphere をピペットで数回、吸引および排出を繰り返すと単一細胞になり、再培養すると neurosphere を再形成し、継代培養が可能である。細胞のほとんどが幹細胞のマーカーであるネスチンに陽性を示すことから、生じた細胞が神経幹細胞であることが判明している。neurosphere は、成長因子を除いた神経培養液や、培養液に血清をわずかでも加えると、底面に付着し分化を始める。分化した細胞はニューロン、アストロサイトおよびオリゴデンドロサイトの抗体で染色され、複数の種類の細胞に分化したことが判明した (図5)。

### Ⅳ. 神経幹細胞の移植による再生医療

神経幹細胞を用いて、ニューロンを再生するための様々な移植研究が行われている<sup>16)</sup>。また、多発性硬化症などのミエリン疾患、脳性麻痺、異痛症および統合失調症はグリア細胞に分化を誘導することが有効と考えられている<sup>17)</sup>。さらに神経幹細胞の移植研究は、まだその機能がよくわかっていない中枢神経核に神経幹細胞を移植することにより、移植された未分化な幹細胞が環境因子の影響を受けて分化後、相互的にネットワークを形成し、機能を発現する過程を観察することで、目的の神経核の性質を調べることも可能である。

移植細胞が目的の部位で目的の神経細胞へ分化誘導するための検討事項を以下に述べる。

#### i) 移植細胞

神経幹細胞は脳内の様々な部分からの採取および培養が可能である。神経幹細胞を多く含む胎仔の海馬歯状回や側脳室下帯から採取すると効率よく培養できる。成熟マウスからの採取も可能であり、培養した神経幹細胞を同一固体に移植すれば、拒絶反応の問題が解決され、今後の再生医療に有用と考えられている。近年、神経幹細胞の分化がみられない脊髄中にも幹細胞に分化できる細胞が存在することが判明した<sup>18)</sup>。さらに神経幹細胞の他にも骨髄幹細胞、間葉系幹細胞およびES細胞などが神経細胞に分化することが判明しており、移植幹細胞の選択肢が増えつつある。最近、乳歯歯髄の中に分化能力が高い間葉系幹細胞が発見された<sup>19)</sup>。この幹細胞は特に神経系の細胞に分化しやすい。脱落した乳歯の歯髄から幹細胞を採取して冷凍保存し、将来の疾患の治療に使用するという時代が到来するかもしれない。

#### ii) 環境因子

移植された神経幹細胞はその環境の影響を大きく受ける。移植した幹細胞を取り巻く環境をニッチという。移植部位によりニッチが異なるため分化動態が大きく



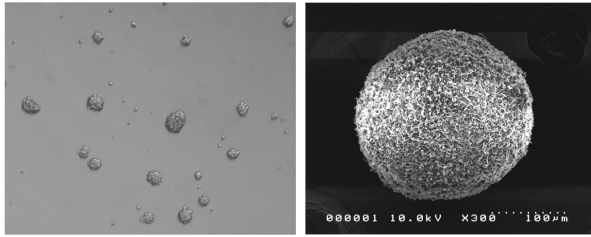


図4 培養により増殖し、浮遊細胞塊 (neurosphere) を形成した EGF 反応性神経幹細胞  
左：光学顕微鏡，右：電子顕微鏡 (SEM) 画像

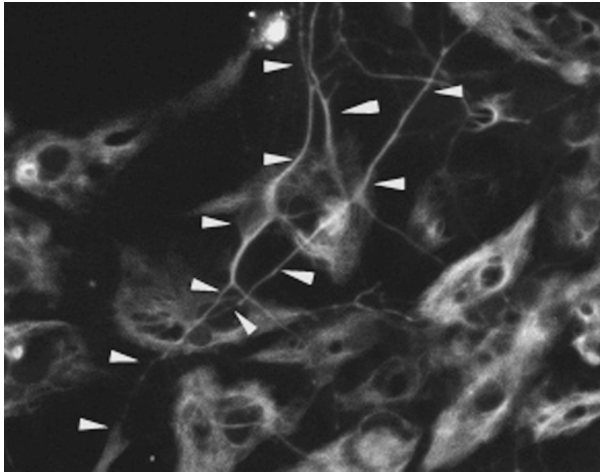


図5 血清を加え *in vitro* で分化させた神経幹細胞  
矢印で示す部分はニューロンのマーカーである  $\beta$ -tubulin の抗体で免疫染色した。その他の細胞はアストロサイトのマーカーである glial fibrillary acidic protein (GFAP) の抗体で免疫染色され、複数の細胞に分化していた。

異なってくる。EGF 反応性神経幹細胞は *in vitro* ではニューロンに分化する率が高い一方、移植実験では、ほとんどの部位で環境因子の影響を受けてアストロサイトやオリゴデンドロサイトのようなグリア細胞に分化する (図6, 上段)。FGF-2 で培養した神経幹細胞の多くも移植後、グリア細胞に分化するが、海馬歯状回や側脳室から嗅脳に移動した移植神経幹細胞はニューロンへの分化率が高い (図6, 下段)。

以下に、再生医療が期待されている中枢神経核の性質を示し、神経幹細胞移植の可能性を示す。

### V. 視床下部の再生

地球上の生物にとって、毎日変化する明期と暗期の時間的変化へ適応することが、その種を維持するための重要な要素となっている。そのため、ほとんどの生物は内因性の生体時計を所有し、昼と夜の変化に適応している。この時計によって出現する表現型をサーカディアンリズムという。ほ乳類では、睡眠覚醒、ホルモン変動、

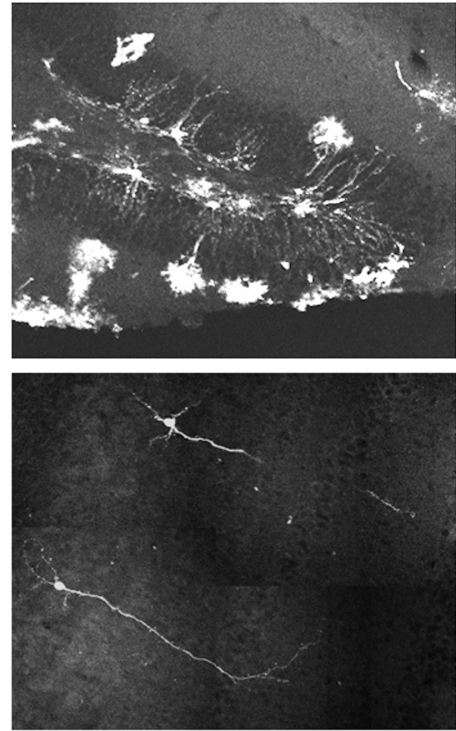


図6 脳内に移植した神経幹細胞  
移植した細胞を区別するため green fluorescent protein マウス (GFP マウス) より採取した神経幹細胞を使用した。EGF 反応性神経幹細胞を海馬歯状回に移植すると、ニューロンに分化しやすい環境であるにも関わらず、ほとんどがアストロサイトに分化した (上図)。一方、FGF-2 反応性神経幹細胞を側脳室に移植すると、移植細胞は rostral migratory stream (RSM) を通り嗅脳に到達してニューロンに分化した (下図)。

体温変動などにサーカディアンリズムがみられるが、これらのリズムの発現中枢は視床下部に存在する視交叉上核 suprachiasmatic nucleus (SCN) にある。近年、振動機構の発振メカニズムが次第に明らかになり、発現遺伝子や神経伝達物質に日内リズムが観察され<sup>20)</sup>、現在最も注目されている研究分野の一つとなっている。この体内時計は外界の光に反応することで明暗周期に同調 (entrain) している。ヒトにおいても、SCN の存在が証明されており、腫瘍などで、SCN が機能なくなると、睡眠・覚醒のリズムが消失することが判明している。

室傍核 paraventricular nucleus (PVN) は、ストレス負荷時に corticotropin-releasing hormone (CRH) 分泌ニューロンが下垂体の ACTH の分泌を促し、これが副腎皮質ホルモンを分泌し、ストレス反応の中心的な役割をはたしている (視床下部-下垂体-副腎皮質系)。PVN には、他に、バソプレッシン、nitric oxide (NO) 産生ニューロンなどが存在している<sup>21)</sup>。また、延髄孤束核からノルアドレナリンや neuropeptide Y (NPY) の入力を受け、

CRH 分泌ニューロンに作用して、ストレス反応や制限給餌における末梢の副腎皮質ホルモンの日内変動に関与している<sup>22)</sup>。視床下部には他にも食欲、体温、および性行動に関与して生命を維持するための神経核が集中している。そのため、これらの神経核に異常が生じると生命活動を維持できないような重要な問題が生じる。視床下部における神経幹細胞移植の意義は、これらの神経核に問題が起こった場合、移植により機能が再生できるか検討することにある。神経核破壊モデルや特定の遺伝子のノックアウトモデルに神経幹細胞を移植し、その機能再生を観察することが検討されている。

新生および成熟マウスの視床下部に神経幹細胞を移植すると移植細胞がすべて消失し、視床下部における移植細胞の生着・分化は困難であった。このことは、視床下部では、移植神経幹細胞が生存しにくい環境であることを示している。しかし、EGF および FGF-2 反応性神経幹細胞を胎生15日目のマウスの脳室に移植し、出生2週間から4週間後の視床下部を観察したところ SCN および PVN に移植細胞が観察された（図7）。これらの細胞はアストロサイトの抗体に陽性を示した。今後、ニューロンに分化させるための条件設定が必要と思われる。

## VI. 孤束核の再生

延髄孤束核 nucleus of the solitary tract (NST) は延髄の背側に位置し、心臓、肺、胃腸および口腔からの情報が迷走神経、舌咽神経および顔面神経を通して入力している。これらの信号は NST で処理された後出力し、これらの臓器の調節に関与しているが、入力された情報の一部は上位中枢である視床や視床下部に伝達される。NST に存在するニューロンは多様であり、ノルアドレナリンなどのカテコールアミン、サブスタンス P、NPY、コレスシトキニン、ガラニン、カルシトニン、ソマトスタチン、パソプレッシン、オキシトシンなどのペプチドおよび GABA、グルタメート、アセチルコリンを分泌する細胞が複雑なネットワークを構成している<sup>23)</sup>。NST 中のニューロンは生涯にわたって軸索や神経突起を延ばし可塑性を有することが知られている<sup>24, 25)</sup>。最近、NST を含む背側迷走神経複合体 dorsal vagal complex (DVC) の細胞中に生後も分裂する神経幹細胞の存在が示唆され、この部位より採取された細胞を培養すると neurosphere が形成されることが判明し、NST 中には海馬歯状回や側脳室下帯と同様な性質を有している神経幹細胞が存在することが判明した<sup>26-28)</sup>。新生マウスの小脳延髄槽に神経幹細胞を移植すると、小脳、三叉神経核、三叉神経脊髄路核および NST に細胞が観察された。生着した細胞のほとんどはグリア細胞に分化していたが、NST に生着した細胞は、ニューロンに分化することが判明し、成熟マウスに移植した実験でも同様の結果が得られた。移植後、グリア細胞に分化することが多い EGF 反応性幹細胞を移植しても、細胞のほとんどがニューロンのマ

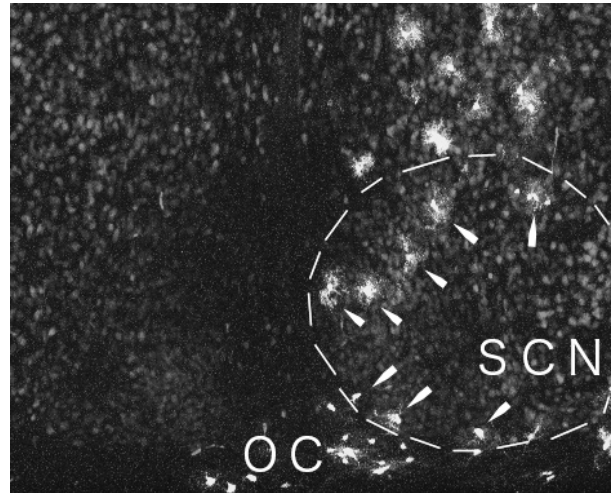


図7 視床下部に移植した FGF-2 反応性神経幹細胞  
左側の SCN（点線の円内）に移植細胞がみられたが（矢印）、アストロサイトに分化していた。PVN にも移植細胞がみられたが、同様の結果であった。OC：Optic Chiasm

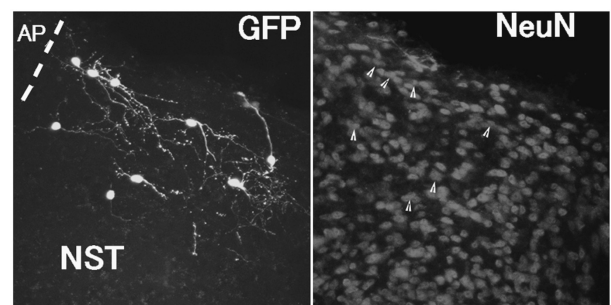


図8 延髄孤束核 (NST) に生着した EGF 反応性神経幹細胞（左図）  
ニューロンのマーカーである NeuN の抗体で免疫染色され（右図：矢印）、ニューロンに分化していた。AP：Area Postrema

カーである NeuN に陽性を示した（図8）。以上の結果より、NST には神経幹細胞が生涯分裂し、ニューロンに分化する環境因子が存在することが示唆された。

## VII. 白質の再生

白質は、ニューロンの神経線維が集まり、それぞれの神経線維の周りをミエリン鞘が取り巻いている部分である。ミエリン鞘はオリゴデンドロサイトにより形成され、ニューロンの神経伝達を円滑にしている。正常なミエリン鞘が形成されないと、神経伝達に問題が生じ、知的障害、運動障害及び、てんかんなどが起こる。ミエリン鞘の異常による疾患として多発性硬化症やヘルトビッヒ・メルツバッハ病などがある。動物疾患モデルとしては、シバーミュータントマウス（シバーマウス）がある。このマウスは、オリゴデンドロサイトに先天異常があ



り、ミエリン形成に関与する myelin basic protein (MBP) を産生できない。そのため、ミエリン形成不全となり肉眼所見では、本来、不透明な白質部が透明に観察される。外部所見として歩行困難、震え及び、てんかん様発作を特徴とし、正常のマウスより寿命が短い。EGF 反応性神経幹細胞を移植すると、選択的に脳梁などの白質に生着し、オリゴデンドロサイトに分化した(図9)。そこで、ミエリン疾患モデルマウスとしてシバーマウスへ EGF 反応性神経幹細胞の移植を試みた。生後1日目のシバーマウスに EGF 反応性神経幹細胞を移植し、2ヵ月後の脳内を観察すると、疾患部である白質に特異的に細胞の生着が観察された。また、MBP の抗体で染色すると本来このマウスが産生できない MBP を産生しており(図10)、以上のことから移植した神経幹細胞が正常なミエリンを形成し、白質を再生していることが判明した<sup>29)</sup>。脳内の複数の部位に細胞を移植し、それぞれの部位で白質が再生されたが、シバーマウスの痙攣発作や歩行障害は改善しなかった。このことから、症状の改善のために、移植法などのさらなる検討が必要と思われた。

### VIII. 終わりに

近年、幹細胞を使用した再生医療の進歩はめざましいものがあり、医療現場において、多くの疾患の治療にこの方法が用いられるようになった。歯科医療における再生医療の中心は、ES 細胞や間葉系幹細胞を用いた歯や骨および歯周組織の再生であり、盛んに研究が行われている。しかし、口腔の機能は中枢神経と深い関わりを持っているにもかかわらず、これに関係する疾患の治療は、対象療法が中心であり、再生医療を用いた根本的治療に対する研究はほとんど行われていないのが現状である。中枢神経の研究は脳神経科学の分野であり、医科の専門家による研究を待つという意見もあるが、医科における中枢神経の再生の試みは、アルツハイマー病、パーキンソン病および脊髄損傷などの治療に集中し、脳性麻痺や脳梗塞による摂食困難に関する再生医療の研究はほとんど行われていない。これらの研究は口腔の機能を熟知している歯科医の仕事であり、歯科医療分野における再生医療として、幹細胞を使用した中枢神経の再生研究の重要性を提示したい。また、これらの研究が医科と歯科の臨床研究の橋渡しとなることを願っている。

### 参考文献

- 1) Thomson J A, Itskovitz-Eldor J, Shapiro S S, Waknitz M A, Swiergiel J J, Marshall V S and Jones J M: Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147 (1998)
- 2) Jiang Y, Jahagirdar B N, Reinhardt R L, Schwartz R E, Keene C D, Ortiz-Gonzalez X R, Reyes M, Lenvik T, Lund T, Blackstad M, Du J, Aldrich S, Lisberg A, Low W C, Largaespada D A and Verfaillie C M: Pluripotency

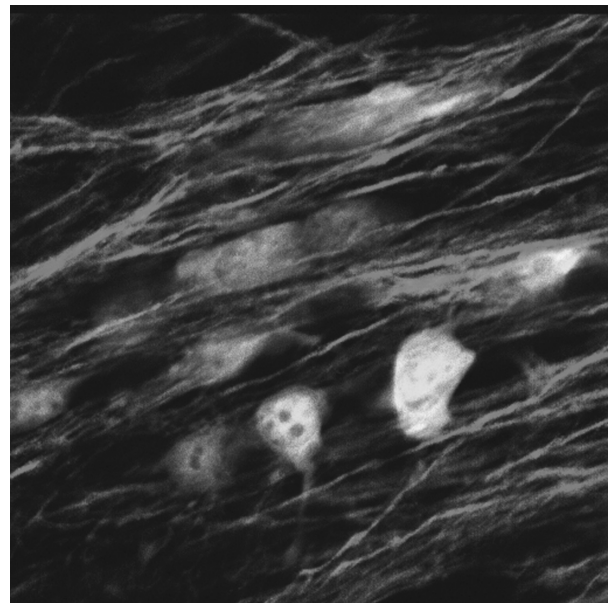


図9 移植後、白質にみられた EGF 反応性神経幹細胞オリゴデンドロサイトのマーカーである2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase (CNPase) の抗体で染色すると局在が一致し、移植細胞がオリゴデンドロサイトに分化していた。

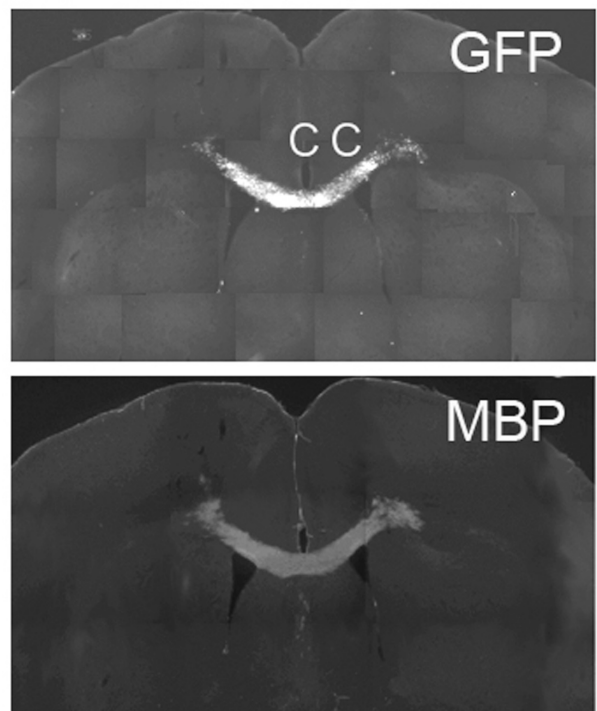


図10 EGF 反応性神経幹細胞をシバーミュータントマウスに移植した。移植神経幹細胞は白質である脳梁 corpus callosum (CC) に選択的に生着し(上図), myelin basic protein (MBP) の抗体で免疫染色され、正常な白質を形成していた(下図)。

- of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature* 418, 41-49 (2002)
- 3) Gage F H: Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433-1438 (2000)
- 4) Alvarez-Buylla A and Garcia-Verdugo J M: Neurogenesis in adult subventricular zone. *J Neurosci* 22, 629-634 (2002)
- 5) Merkle F T, Mirzadeh Z and Alvarez-Buylla A: Mosaic organization of neural stem cells in the adult brain. *Science* 317, 381-384 (2007)
- 6) Kempermann G, Kuhn H G and Gage F H: More hippocampal neurons in adult mice living in an enriched environment. *Nature* 386, 493-495 (1997)
- 7) Van Praag H, Kempermann G and Gage F H: Running increases cell proliferation and neurogenesis in the adult mouse dentate gyrus. *Nat Neurosci* 2, 266-270 (1999)
- 8) Jones J A, Lavalley N, Alman J, Sinclair C and Garcia R I: Caries incidence in patients with dementia. *Gerodontology* 10, 76-82 (1993)
- 9) Onozuka M, Fujita M, Watanabe K, Hirano Y, Niwa M, Nishiyama K and Saito S: Age-related changes in brain regional activity during chewing: a functional magnetic resonance imaging study. *J Dent Res* 82, 657-660 (2003)
- 10) Onozuka M, Watanabe K, Fujita M, Tomida M and Ozono S: Changes in the septohippocampal cholinergic system following removal of molar teeth in the aged SAMP8 mouse. *Behav Brain Res* 133, 197-204 (2002)
- 11) Terasawa H, Hirai T, Ninomiya T, Ikeda Y, Ishijima T, Yajima T, Hamaue N, Nagase Y, Kang Y and Minami M: Influence of tooth-loss and concomitant masticatory alterations on cholinergic neurons in rats: immunohistochemical and biochemical studies. *Neurosci Res* 43, 373-379 (2002)
- 12) Kato T, Usami T, Noda Y, Hasegawa M, Ueda M and Nabeshima T: The effect of the loss of molar teeth on spatial memory and acetylcholine release from the parietal cortex in aged rats. *Behav Brain Res* 83, 239-242 (1997)
- 13) Mitome M, Hasegawa T and Shirakawa T: Mastication influences the survival of newly generated cells in mouse dentate gyrus. *Neuroreport* 16, 249-252 (2005)
- 14) Weiss S, Dunne C, Hewson J, Wohl C, Wheatley M, Peterson a C and Reynolds B A: Multipotent CNS stem cells are present in the adult mammalian spinal cord and ventricular neuroaxis. *J Neurosci* 16, 7599-7609 (1996)
- 15) Gritti A, Parati E A, Cova L, Frolichsthal P, Galli R, Wanke E, Faravelli L, Morassutti D J, Roisen F, Nickel D D and Vescovi a L: Multipotential stem cells from the adult mouse brain proliferate and self-renew in response to basic fibroblast growth factor. *J Neurosci* 16, 1091-1100 (1996)
- 16) Gage F H, Coates P W, Palmer T D, Kuhn H G, Fisher L J, Suhonen J O, Peterson D A, Suhr S T and Ray J: Survival and differentiation of adult neuronal progenitor cells transplanted to the adult brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 11879-11883 (1995)
- 17) Winkler C, Fricker R A, Gates M A, Olsson M, Hammang J P, Carpenter M K and Bjorklund A: Incorporation and glial differentiation of mouse EGF-responsive neural progenitor cells after transplantation into the embryonic rat brain. *Mol Cell Neurosci* 11, 99-116 (1998)
- 18) Shihabuddin L S, Horner P J, Ray J and Gage F H: Adult spinal cord stem cells generate neurons after transplantation in the adult dentate gyrus. *J Neurosci* 20, 8727-8735 (2000)
- 19) Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher L W, Robey P G and Shi S: SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 5807-5812 (2003)
- 20) Mitome M, Shirakawa T, Oshima S, Nakamura W and Oguchi H: Circadian rhythm of nitric oxide production in the dorsal region of the suprachiasmatic nucleus in rats. *Neurosci Lett* 303, 161-164 (2001)
- 21) Shirakawa T, Mitome M, Kikuri T, Nakamura W, Oshima S, Hasegawa T, Shindoh M and Oguchi H: Immobilization induces acute nitric oxide production in the rat hypothalamus: a role of ionotropic glutamate receptors in the paraventricular nucleus. *Endocrinology* 145, 3603-3607 (2004)
- 22) Mitome M, Honma S, Yoshihara T and Honma K: Prefeeding increase in paraventricular NE release is regulated by a feeding-associated rhythm in rats. *Am J Physiol* 266, E606-611 (1994)
- 23) Maley B E: Immunohistochemical localization of neuropeptides and neurotransmitters in the nucleus solitarius. *Chem Senses* 21, 367-376 (1996)
- 24) Vincent A and Tell F: Postnatal development of rat nucleus tractus solitarius neurons: morphological and electrophysiological evidence. *Neuroscience* 93, 293-305 (1999)
- 25) Kawai Y and Senba E: Postnatal differentiation of local networks in the nucleus of the tractus solitarius. *Neuroscience* 100, 109-114 (2000)
- 26) Moyse E, Bauer S, Charrier C, Coronas V, Krantic S and Jean A: Neurogenesis and neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat brain: new vistas about autonomic regulations--a review. *Auton Neurosci* 126-127, 50-58 (2006)
- 27) Bauer S, Hay M, Amilhon B, Jean A and Moyse E: In

vivo neurogenesis in the dorsal vagal complex of the adult rat brainstem. *Neuroscience* 130, 75-90 (2005)

- 28) Charrier C, Coronas V, Fombonne J, Roger M, Jean A, Krantic S and Moyse E: Characterization of neural stem cells in the dorsal vagal complex of adult rat by in vivo proliferation labeling and in vitro neurosphere assay. *Neuroscience* 138, 5-16 (2006)
- 29) Mitome M, Low H P, Van Den Pol A, Nunnari J J, Wolf M K, Billings-Gagliardi S and Schwartz W J: Towards the reconstruction of central nervous system white matter using neural precursor cells. *Brain* 124, 2147-2161 (2001)